

## 硝子体手術と毛様体の細胞応答

著者	水戸 武三
学位授与機関	Tohoku University
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/54889">http://hdl.handle.net/10097/54889</a>

博 士 論 文

硝子体手術と毛様体の細胞応答

東北大学医学部附属病院眼科

水 戸 武 三



①

博 士 論 文

硝子体手術と毛様体の細胞応答

東 北 大 学 医 学 部 附 属 病 院 眼 科

水 戸 い 武 三



# I . 緒 言

近年、手術手技や手術装置・器具の改良にともない、硝子体手術の一般的普及とその手術適応の広がりが見られるようになった。このため硝子体腔は硝子体出血、難治性網膜剥離、糖尿病性網膜症や眼内炎などの硝子体網膜疾患の外科療法の間として最も大切な部位となっている。しかし、技術面、臨床面が先行し、硝子体手術や一時的なタンポナーデ効果のための硝子体置換による各眼組織に対する影響についての基礎的な面からのアプローチが遅れ、検討が不十分のように思われる。硝子体手術時、硝子体手術器具の出し入れ、眼内灌流液、手術中の眼圧の変化などにより毛様体は直接的間接的に眼内組織の中でもかなりの損傷をうけていることが考えられる。毛様体、特に毛様突起は血管に富む結合組織実質とそれを取り囲む2層の上皮細胞からなる。この2層の毛様体上皮のうち色素



上皮細胞は実質上にあり、その基底膜は Bruch 膜から続いて形成され、また無色素上皮細胞の基底膜は毛様体の内境界膜であり、後房に面し、お互いの頂部が向かい合うという特殊な解剖学的特徴をもつ<sup>1)</sup>。特に無色素上皮細胞はそれぞれの apical membrane 直下の細胞間に tight junction をもち、主要な血液-眼房水関門を形成している<sup>1)</sup>。また無色素上皮細胞はミトコンドリア、小胞体に富み、Na-K ATPase<sup>2)</sup>, carbonic anhydrase<sup>3)</sup>, ornithine aminotransferase<sup>4, 5)</sup>などの酵素の存在が知られ、眼房水産生の能動輸送に主要な役割を担っている。特に ouabain-sensitive Na-K adenosine triphosphatase (以下 Na-K ATPase と略す) はあらゆる細胞に存在するが、毛様体、網膜などのようなイオンの移動の活発な組織では特に活性が高い<sup>2, 6, 7)</sup>。毛様体における Na-K ATPase は Bonting ら<sup>2)</sup>によりその存在があきらかにされた。さらにその局在については組織学的方



法により、無色素上皮細胞層の特に lateral interdigitation 部の形質膜に活性が高く<sup>8-14)</sup>、色素上皮細胞層にはほとんど活性が認められないこと<sup>15, 16)</sup>が明らかにされている。

家兎の実験的硝子体手術による毛様体の細胞応答を見るために、毛様体において重要な酵素である Na-K ATPase をマーカーとして、その生化学的活性の変化を経時的に測定し、六ふっ化硫黄（以下 SF<sub>6</sub>と略す）やシリコンオイルの硝子体置換の併用による酵素活性の変化も測定した。また同時に光学顕微鏡により毛様突起の変化を観察した。



## Ⅱ . 方 法

### 1 ) 実 験 的 硝 子 体 手 術

白 色 家 兎 ( 体 重 約 2 kg ) を 用 い 、 塩 酸 ケ タ ミ ン 4 ml と キ シ ラ ジ ン 0.4 ml 混 合 液 を 0.8 ml / kg 筋 注 し 、 全 身 麻 酔 下 に 手 術 を 行 な っ た 。 右 眼 を 手 術 眼 と し 、 左 眼 を そ の と き の 対 照 眼 と し た 。 手 術 眼 は ト ロ ピ カ マ イ ド 、 塩 酸 フ ェ ニ レ フ リ ン の 点 眼 薬 で 散 瞳 し 、 ベ ノ キ シ ール で 点 眼 麻 酔 し た 。 硝 子 体 手 術 装 置 は Peyman Vitrophage 9000 を 用 い 、 Kaplan ら<sup>17)</sup> の 方 法 に よ り 水 晶 体 を 含 め た 硝 子 体 切 除 術 を 行 な っ た 。 手 術 顕 微 鏡 下 に 、 結 膜 嚢 を 基 底 と す る 結 膜 弁 を 作 り 、 強 角 膜 輪 部 よ り 後 方 1 mm に 半 層 の 強 膜 切 開 を 行 な っ た 。 8-0 ナ イ ロ ン 糸 で 前 置 縫 合 し た 上 で 、 18 ゲ ー ジ 針 で 強 膜 創 を 作 っ た 。 Peyman Vitrophage を 眼 内 に 挿 入 し 、 水 晶 体 お よ び 硝 子 体 を 切 除 吸 引 し た 。 手 術 中 に 用 い た 眼 内 灌 流 液 は リ ン ゲ ル 乳 酸 液 に 5.0 mM 葡 萄 糖 と 18.3 mM 重 炭 酸 ナ ト リ ウ ム を



加えたもの（以下 Ringer's lactate plus solution と略す）を用いた<sup>18-20</sup>）。また Ringer's lactate plus（硝子体手術単独群）のかわりに SF<sub>6</sub>（SF<sub>6</sub> 注入群）やシリコンオイル（シリコンオイル注入群）による硝子体置換も行なった。強膜創および結膜弁は 8-0 ナイロンで縫合閉鎖した。エリスロマイシン眼軟膏を塗布し手術を終えた。硝子体手術後，術直後，7 時間，1 日，3 日，7 日，14 日目に sodium pentobarbital を致死量静注し，ただちに眼球摘出した。なお術中術後に硝子体出血、網膜剥離または緑内障が認められたものは除外した。

## 2) 試料の調製

試料の調製は Mittag<sup>21)</sup> の方法をもとに、摘出した眼球を赤道部で半割し，虹彩毛様体を一塊として取り出した。この組織に緩衝液（0.32 M sucrose, 1 mM EGTA, 30 mM histidine, pH 7.0）を加えた。この緩衝液中



で細切した上で、Biotron homogenizerにて一定条件でホモジェナイズした。その試料を遠心分離（ $1000 \times g$ ，10分間， $4^{\circ}\text{C}$ ）し、その上清を再び遠心分離（ $12000 \times g$ ，60分間， $4^{\circ}\text{C}$ ）した。その沈査に 0.1% deoxycholate sodium salt を含む 0.25M sucrose 溶液を加え、glass-Teflon homogenizerでホモジェナイズし、それを遠心分離（ $100,000 \times g$ ，60分間， $4^{\circ}\text{C}$ ）した。得られた沈査に蒸留水を加え、超音波破碎により懸濁液として、これを試料とした（図1）。

### 3) Na-K ATPase 活性の測定

反応液（1）97mM Tris-HCl (pH 7.5)，72.5mM NaCl，6.25mM KCl，1mM EGTA または反応液（2）（1）に 2mM ouabain を添加したものに試料を加え  $37^{\circ}\text{C}$ ，10分間 プレインキューベーションした。次に 2mM ATP と 5mM  $\text{MgCl}_2$  を加え  $37^{\circ}\text{C}$ ，20分間 インキューベーションした後、12% SDS で反応を停止させた<sup>21)</sup>。反応の結果得られた遊離 Pi の測定<sup>22)</sup>は 1% ammonium-



molybdateと6% ascorbic acidを含む1N 塩酸を加え、5分後、2% sodium citrate, 2% sodium meta-arseniteを含む2%酢酸を加え、37℃, 10分間インキュベーションして850nmの吸光度を測定した(図2)。Ouabain-sensitive Na-K ATPase 活性は反応液(1)と(2)でえられた量の差で求めた。蛋白質濃度はLowry法を用いた。統計的方法はt検定を用いて行なった。

光学的顕微鏡観察のためには、眼球摘出後ただちに眼球を赤道部で半割し、periodate-lysine-paraformaldehydeで固定し、パラフィン包埋した。切片はヘマトキシレン-エオシン染色し観察した。



### Ⅲ . 結 果

#### 1 ) 虹 彩 毛 様 体 の Na - K A T P a s e の 酵 素 学 的 性 質

虹 彩 毛 様 体 の Na - K A T P a s e の 反 応 速 度 と 酵 素 量 の 関 係 は 図 2 の 方 法 に 従 っ て 測 定 し た 。 反 応 時 間 を 2 0 分 間 と し 、 試 料 を  $0 \mu\text{l}$  か ら  $90 \mu\text{l}$  ま で 変 え た 時 の 反 応 産 物 で あ る 遊 離  $\text{P}_i$  の 量 は 、 酵 素 量 が  $45 \mu\text{l}$  ( 蛋 白 質 量  $14.4 \mu\text{g}$  ) ま で 直 線 的 に 増 加 し た ( 図 3 ) 。 以 後 反 応 産 物 が 直 線 的 に 増 加 す る 範 囲 で 測 定 を 行 な っ た 。

反 応 時 間 と 反 応 産 物 の 関 係 で は 試 料  $40 \mu\text{l}$  (  $12.8 \mu\text{g}$  ) を 用 い 、 反 応 時 間 を 0 分 か ら 50 分 ま で 変 え て 反 応 産 物 を 測 定 し た 。 反 応 産 物 で あ る 遊 離  $\text{P}_i$  の 量 は 図 4 に 示 さ れ る よ う に 30 分 ま で 直 線 的 に 増 加 し た 。

試 料  $40 \mu\text{l}$  (  $12.8 \mu\text{g}$  ) 、 反 応 時 間 20 分 間 で 図 2 の 反 応 液 の pH を 5.0 - 7.5 ( Tris - maleate buffer ) , 7.0 - 9.5 ( Tris - HCl buffer ) と 変 え て Na - K A T P a s e 活 性 を 測 定 し た 。 反 応



産物である遊離  $P_i$  の量から図 5 に示すように 7.0 から 8.0 がこの酵素の至適 pH であった。

試料  $40 \mu l$  ( $12.8 \mu g$ )、反応時間 20 分間で基質である ATP 量を  $0-3.0 mM$  ( $Mg^{2+}/ATP = 2.5$ ) と変えて酵素活性を測定した (図 6)。  
ラインウィーバー・バークの方法によりプロットすると、みかけの  $K_m$  値は  $0.3 mM$  であった。

## 2) 用いた家兔眼数と虹彩毛様体の $Na-K$ ATPase 活性の関係

少ない試料を用いた場合の酵素の回収率が問題となるので、図 1, 2 の試料の調製および反応条件下で、試料として用いた家兔の眼数による酵素活性の違いについて測定した。表 1 に示すように 1 眼でも複数眼と同等な酵素活性が得られ、この酵素活性を測定するのに 1 眼で十分であることが証明された。

## 3) 虹彩毛様体の $Na-K$ ATPase 活性の眼内組織の分布



眼組織における生化学的分布を見るため、角膜、網脈絡膜および虹彩毛様体において Na-K ATPase 活性を測定し、表 2 のように虹彩毛様体 ( $4.84 \pm 0.78 \mu \text{ moles Pi liberated/mg/h}$ ) では網脈絡膜 ( $4.55 \pm 1.13 \mu \text{ moles Pi liberated/mg/h}$ ) とほぼ等しい高い酵素活性が得られた。(以後の酵素活性の表示は平均  $\pm$  標準偏差  $\mu \text{ moles Pi liberated/mg/h}$  とし、単位は省略する。)

#### 4) 硝子体手術による毛様体の組織学的変化

硝子体手術後、1 日目 (図 7) では毛様突起の実質の浮腫 (\*) が著明である。また扁平な核は色素上皮細胞のもので、丸い核は無色素上皮細胞の核であるが、図 8 のように無色素上皮細胞の脱落している部分 (矢印) も一部認められた。術後 2 週目 (図 9) になると実質の浮腫 (\*) は改善しつつあった。図 10 では丸い核をもつ無色素上皮細胞の重層化している部分 (矢印) が見られ、増



殖性変化と考えられる。さらに図11では興味深いことに毛様突起の基部付近に矢印に示すような色素上皮細胞の一部が無色素上皮細胞の間に入り込んでいると考えられる部分も見られ、色素上皮細胞が毛様体上皮の再生に関わっていることが示唆される。

SF<sub>6</sub>注入群（図12）およびシリコンオイル注入群（図13）では1日目では血管の拡張と強い実質の浮腫（\*）をともなっていて、2週目になっても硝子体手術単独群と比べると実質の浮腫（\*）と血管の拡張は強かった。（図14, 15）。

#### 5) 硝子体手術後の虹彩毛様体のNa-K ATPase活性の変化

硝子体手術後の虹彩毛様体のNa-K ATPase活性の測定は図2に示したように、それぞれ試料は蛋白質量として約10 $\mu$ g使用し、反応時間を20分間として測定した。図16に示すように硝子体手術直後の手術眼の酵素



活性 ( $4.55 \pm 0.9$ ) はその対照眼 (硝子体手術眼の対側の非手術眼) ( $4.18 \pm 1.3$ ) とほとんど変わらないが、7 時間目 ( $8.90 \pm 2.1$ ) には対照眼と比べ約 2.3 倍酵素活性が高くなり、1 日目 ( $4.55 \pm 0.9$ )、3 日目 ( $6.11 \pm 0.2$ ) ともそれぞれの対照眼に比べ約 1.5 倍と依然高い状態が続いた。しかし 1 週間目 ( $3.75 \pm 0.6$ )、2 週目 ( $4.94 \pm 0.4$ ) はそれぞれの対照眼と同程度になった。このように硝子体手術後、虹彩毛様体の Na-K ATPase 活性は術後一過性に有意 ( $p < .01$ ) に上昇し、1 週間目にはもとに戻った。

また硝子体手術を行ない、引き続き SF<sub>6</sub> とシリコンオイルを注入し、硝子体置換術を行なった。それぞれについて術後の Na-K ATPase 活性の測定を行なった (図 17)。術後 7 時間目には SF<sub>6</sub> 注入群 ( $7.87 \pm 0.45$ ) およびシリコンオイル群 ( $8.78 \pm 1.33$ ) は硝子体手術単独群と同様に非常に高い酵素活性を示し、その後次第に酵素活性は減少したが、2



週目になっても  $\text{SF}_6$  ( $7.03 \pm 0.90$ ), シリコンオイル ( $6.63 \pm 0.34$ ) 注入群とももとには戻って  
いなかった。

一方、硝子体手術単独、 $\text{SF}_6$  注入群  
およびシリコンオイル注入群の対照眼におけ  
る  $\text{Na-K ATPase}$  活性について比較してみた（  
図 18）。 $\text{SF}_6$  注入群およびシリコンオイル  
注入群では硝子体手術単独群と異なり、対照  
眼にも酵素活性の上昇がみられた。



#### IV . 考 案

眼組織、特に毛様体におけるNa-K ATPase活性の生化学的測定に関する報告<sup>2, 6, 21, 23</sup>)はいくつかあるが、硝子体手術後のNa-K ATPase活性を生化学的に測定するためには、試料として何眼も用いるわけにはいかず、できるだけ少ない試料で行なう必要があった。ここで示した膜分画を用いた酵素活性の測定法<sup>21, 22</sup>)では、1眼の毛様体でも複数眼と同等の酵素活性を測定することができた(表1)。

硝子体手術による毛様体の細胞応答を知るため、光学的顕微鏡観察とともに、毛様体上皮細胞に存在し房水産生に関与する重要な細胞膜酵素であるNa-K ATPase活性をそのマーカーとして生化学的に測定した。光学的顕微鏡観察では、硝子体手術直後は毛様体実質の浮腫が強く血管拡張が著しいが、2週目ではかなり改善しつつあった(図7, 9)。



一方硝子体手術後の Na-K ATPase 活性は7時間目をピークとし3日目まで一過性に増加し、1週目以降は対照と同レベルに回復した。

Na-K ATPase 活性の増加の機序として2つの可能性が考えられる。1つめは毛様体の血管透過性の亢進にもとづく毛様体上皮細胞内の Na 濃度増加により Na-K ATPase 活性が増加する場合である。2つ目は硝子体手術により prostaglandins が放出され<sup>24)</sup>、細胞内 c-AMP の増加<sup>25)</sup>を介して Na-K ATPase 活性が増加する可能性<sup>26)</sup>であるが詳細は不明である。

Berggren ら<sup>27, 28)</sup>は浮腫腫脹を起こさせた毛様突起において ouabain により阻害される毛様突起の縮小、容積の減少がみられることを報告し、毛様体浮腫に対して Na-K ATPase が関与する能動的水輸送が起こることを示している。このことから硝子体手術により毛様体の血管透過性の亢進により起こったと考えられる毛様体の浮腫の改善に、一過性



に活性の増加した Na-K ATPase が関わっていると考えられる。

シリコンオイルや SF<sub>6</sub> は不燃性で化学反応を起こさず毒性がないとされ、特に SF<sub>6</sub> は水にわずかしかとけないため硝子体腔から血液への移行が遅く空気に比べ約 2 倍長くタンポナーゼ効果をもつため硝子体手術に併用して用いられる<sup>29)</sup>。今回、シリコンオイルや SF<sub>6</sub> 注入眼では、光学的顕微鏡観察において手術直後は硝子体手術単独と同様であるが、2 週目の毛様体を比べると浮腫腫脹が強くなりその回復は遅かった。一方 Na-K ATPase 活性は 3 日まで硝子体手術単独群と同様に一過性に上昇するが、2 週目でも酵素活性は高かった。このことから SF<sub>6</sub> 自体の刺激性の可能性やガスが眼球運動により機械的刺激を起こす可能性が示唆される。この SF<sub>6</sub> の刺激性を裏付けるいくつかの報告がある。

Constable ら<sup>30)</sup> は硝子体腔中に SF<sub>6</sub> が残存するあいだ血管の透過性が亢進していることを、



また Killly ら<sup>31)</sup>、島田ら<sup>32)</sup>は血液房水関門の障害とその回復遅延を報告している。

手術眼の対眼について硝子体手術単独、SF<sub>6</sub>注入群およびシリコンオイル注入群について比較すると、SF<sub>6</sub>注入群、シリコンオイル注入群では、対照眼でも Na-K ATPase 活性の上昇がみられた。その機序については不明であるが、非手術眼にも影響を及ぼすようなコントロールシステムが存在することが示唆された。



## V . 結 語

硝子体手術による毛様体への影響、細胞応答について述べた。硝子体手術後、虹彩毛様体の Na-K ATPase 活性は7時間目に急激に上昇し、3日目まで漸減し、1週目以降正常範囲に戻った。SF<sub>6</sub>そしてシリコンオイルの硝子体置換術を併用すると、直後から3日目までは硝子体手術単独と同じ経過を示したが、2週目でももとのレベルに戻らなかった。SF<sub>6</sub>やシリコンオイルの硝子体置換術を行なった場合、それぞれの対照眼にまで影響を及ぼす可能性のあることが示された。



## 文 献

1) Moses RA, Hart WM, Jr: Adler's physiology of the eye: 204-222, Mosby company, 1987

2) Bonting SL, Simon KA and Hawkins NM: Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. Arch Biochem Biophys 96: 416-423, 1961

3) Wistrand PJ: Carbonic anhydrase in the anterior uvea of the rabbit. Acta Physiol Scand 24: 144-148, 1951

4) 水戸 武三, 石黒 誠一, 水野 勝義, 大浦 敏博, 多田 啓也: 免疫組織化学による Ornithine aminotransferase の眼組織内局在. 日本眼科紀要 38: 1205-1209, 1987



5) Mito T, Shiono T, Ishiguro S,  
Tamai M, Mizuno K and Ohura T: Immuno-  
cytochemical localization of ornithine  
aminotransferase in human ocular tissues.  
Arch Ophthalmol 107:1372-1374, 1989

6) Riley MV: The sodium-potassium-  
stimulated adenosine triphosphatase of  
rabbit ciliary epithelium. Exp Eye Res  
3:76-84, 1964

7) 水戸 武三, 石黒 誠一, 玉井  
信: Na-K ATPase 活性の眼組織内分布. 日本  
眼科紀要 (印刷中), 1990

8) Cole DF: Localization of  
ouabain-sensitive adenosine tri-  
phosphatase in ciliary epithelium. Exp  
Eye Res 3:72-75, 1964



9) Shiose Y and Sears M:

Localization and other aspects of the  
histochemistry of nucleoside  
phosphatases in the ciliary epithelium  
of albino rabbits. Invest Ophthalmol Vis  
Sci 4:64-75, 1965

10) Shiose Y and Sears M: Fine

structural localization of nucleoside  
phosphatase activity in the ciliary  
epithelium of albino rabbits. Invest  
Ophthalmol Vis Sci 5:152-165, 1966

11) Uusitalo R and Palkama A: A

localization of sodium-potassium  
stimulated adenosine triphosphatase  
activity in the rabbit ciliary body  
using light and electron microscopy. Ann  
Med Exp Biol Fenn 48:84-88, 1970



12) Palkama A and Uusitalo R: The histochemical demonstration of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase activity in rabbit ciliary body. Ann Med Exp Biol Fenn 48: 49-55, 1970

13) Flugel C and Lutjen-Drecoll E: Presence and distribution of Na/K-ATPase in the ciliary epithelium of the rabbit. Histochemistry 613-621, 1987

14) Usukura J, Fain GL and Bok D: <sup>3</sup>H ouabain localization of Na-K ATPase in the epithelium of rabbit ciliary body pars plicata. Invest Ophthalmol Vis Sci 29: 606-614, 1988

15) Shimizu H: Na-K stimulated ATPase activity in separated non-pigmented and pigmented cells of ciliary process. Invest Ophthalmol 6: 449, 1967



16) Shimizu H and Riley MV and  
Cole DF: The isolation of whole cells  
from the ciliary epithelium together  
with some observations on the metabolism  
of the two cell types. Exp Eye Res 6:141  
-151, 1967

17) Kaplan HJ, Diamond JG, and  
Brown SA: Vitrectomy in experimental  
uveitis. I. Operative technique in  
rabbits. Arch Ophthalmol 97:331-335, 1979

18) Negi A, Honda Y, and Kawano S:  
Effect of intraocular irrigating  
solution on the electroretinographic b-  
wave. Am J Ophthalmol 92:28-37, 1981

19) Negi A, Honda Y, and Kawano S:  
Importance of bicarbonate ion in the  
vitreous space. Arch Ophthalmol 100:1839-  
1843, 1982



20) Tamai M and Mizuno K: Acid  
base balance of perfusion fluid used for  
vitreous surgery. Jpn Rev. Clin.

Ophthalmol 80:1929-1932, 1986

21) Mittag TW, Serle JB, Podos SM,  
Cohen L and Liebowitz F: Vanadate effect  
on ocular pressure. (Na, K) ATPase and

adenylate cyclase in rabbit eyes. Invest  
Ophthalmol Vis Sci 25:1335-1338, 1984

22) Chifflet S, Torriglia A, and  
Tolosa S: A method for the determination  
of inorganic phosphate in the presence

of labile organic phosphate and high  
concentrations of protein: application to  
lens ATPases. Anal Biochem 168:1-4, 1988

23) Riley MV and Kishida K:  
ATPases of ciliary epithelium: cellular  
and subcellular distribution and humor.

Exp Eye Res 42:559-568, 1986



24) 島田 宏之 : 硝子体手術に関する基礎的研究, その3, 猿眼血液眼関門の障害と prostaglandins の関与に関する電子顕微鏡的研究. 日本眼科学会雑誌. 91:360-376, 1977

25) 斉藤 禎隆 : 毛様体上皮のイオン輸送. 膜 (MEMBRANE). 8:66-74, 1983

26) Sears ML and Mead A: A major pathway for the regulation of intra-ocular pressure. Internatl Ophthalmol 6: 201-212, 1983

27) Berggren L: Direct observation of secretory pumping in vitro of the rabbit eye ciliary processes. Invest Ophthalmol 3:266-272, 1964

28) Berggren L: Effect of composition of medium and of metabolic inhibitors on secretion in vitro by the ciliary processes of the rabbit eye. Invest Ophthalmol 4:83-90, 1965



29) Smith RB, Carl B, Linn JG, Jr,  
and Nemoto E: Effect of nitrous oxide on  
air in vitreous. Am J Ophthalmol 78:314-  
317, 1974

30) Constable IJ and Swann DA:  
Vitreous substitution with gases. Arch  
Ophthalmol 93:416-419, 1975

31) Killey FP, Edelhauser HF and  
Aaberg TA: Intraocular fluid dynamics.  
Arch Ophthalmol 98:1448-1452, 1980

32) 島田 宏之, : 硝子体手術に関する基礎的研究 (実験的. 硝子体出血猿眼における、毛様体、虹彩、隅角への影響) 日本  
眼科紀要 36:1576-1583, 1985



表1. 試料の量の変化とNa-K ATPase活性

使用した眼球の数	Na-K ATPase 活性 ( $\mu$ moles Pi liberated/mg/h)
9 眼	5.72
6 眼	4.86
2 眼	5.60, 3.97, 4.35, 5.81
1 眼	5.77, 4.65, 3.45, 4.15, 4.42 4.95, 4.90, 5.58, 5.72

表2. 白色家兎 Na-K ATPase の眼組織内分布

	Na-K ATPase 活性 ( $\mu$ moles Pi liberated/mg /h)
角膜	$2.37 \pm 0.56$ (n=5)
網脈絡膜	$4.55 \pm 1.13$ (n=5)
虹彩毛様体	$4.84 \pm 0.78$ (n=9)

(平均 $\pm$ 標準偏差)



#### 図1. 酵素液の調製

白色家兎の眼組織

← 30mM histidine, 1mM EGTA を含む 0.32M 蔗糖 (pH 7.0)

↓

細切, ホモジェネート (Biotron homogenizer)

↓

遠心分離 (1,000xg, 10分間, 4°C)

↓

上清の遠心分離 (12,000xg, 60分間, 4°C)

↓

沈査

← 0.1% deoxycholate sodium saltを含む 0.25M 蔗糖

↓

ホモジェネート (glass-Teflon homogenizer)

↓

遠心分離 (100,000xg, 60分間, 4°C)

↓

沈査

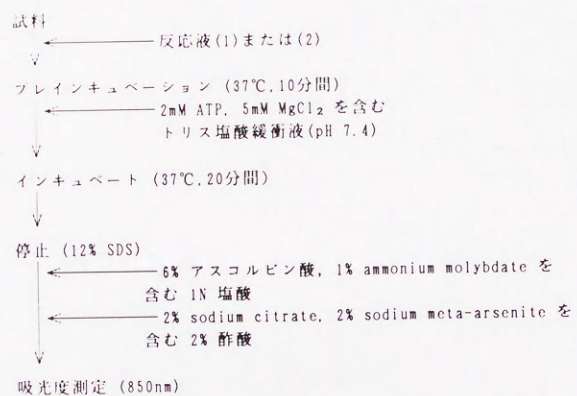
← 蒸留水

↓

sonication → 試料



図2. Na-K ATPase 活性の測定



反応液の組成

	(1)	(2)
Tris-HCl buffer (pH 7.4)	97 mM	97 mM
NaCl	72.5 mM	72.5 mM
KCl	6.25 mM	6.25 mM
EGTA	1 mM	1 mM
Ouabain	—	2 mM



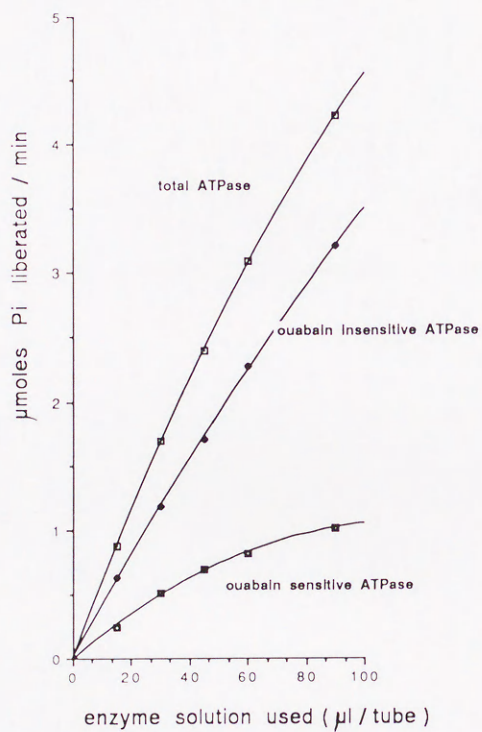


図3 虹彩毛様体の Na-K ATPase の反応速度と酵素量の関係  
 反応時間20分間で試料を 0 μl から 90 μl (蛋白質量 28.9 mg) まで変えた時の反応産物である遊離 P<sub>i</sub> の量を示す。



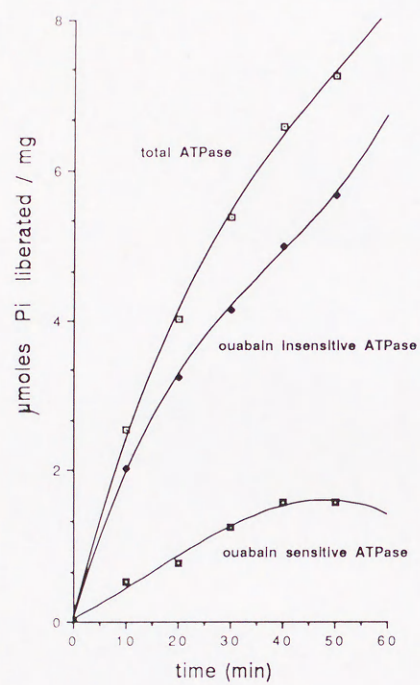


図4 虹彩毛様体の Na-K ATPase の反応時間と反応産物の関係  
 試料40  $\mu$ l (蛋白質量12.8mg) を用い、反応時間を0分から50分まで  
 変えたときの反応産物である遊離Piの量を示す。



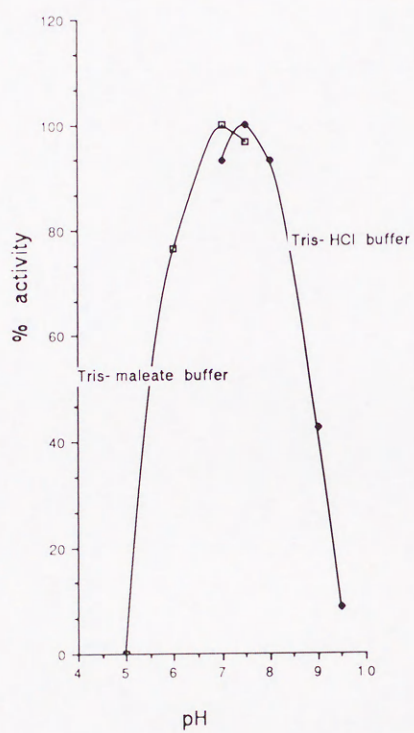


図5 虹彩毛様体の Na-K ATPase の至適pH  
 試料40 $\mu$ l (蛋白質量12.9mg)、反応時間20分間で図2の反応液の pHを 5.0-7.5(Tris-maleate buffer), 7.0-9.5(Tris-HCl buffer)と変えた時の反応産物である遊離Piの量を測定した。



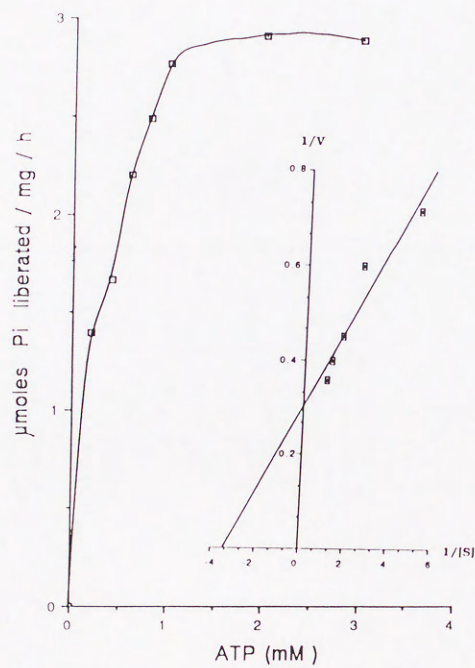


図6 虹彩毛様体の Na-K ATPase の見かけの $K_m$ 値  
 試料 $40\mu\text{l}$  (蛋白質量 $12.9\text{mg}$ )、反応時間20分間で基質である ATP量  
 を $0-3.0\text{mM}$  ( $\text{Mg}^{2+}$  ATP $=2.5$ )と変えて酵素活性を測定した。



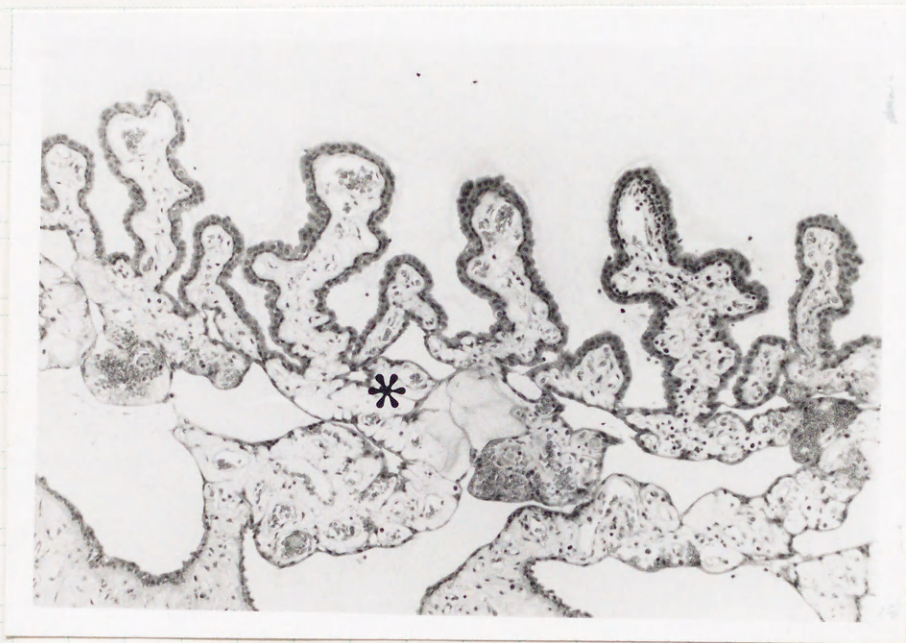


図 7 硝子体手術後 1 日目 (x100)

毛様突起の実質の浮腫 ( \* ) が著明である。





図 8 硝子体手術後 1 日目 (x400)

扁平な核は色素上皮細胞のもので、丸い核は無色素上皮細胞の核であるが、無色素上皮細胞の脱落している部分（矢印）も一部認められた。



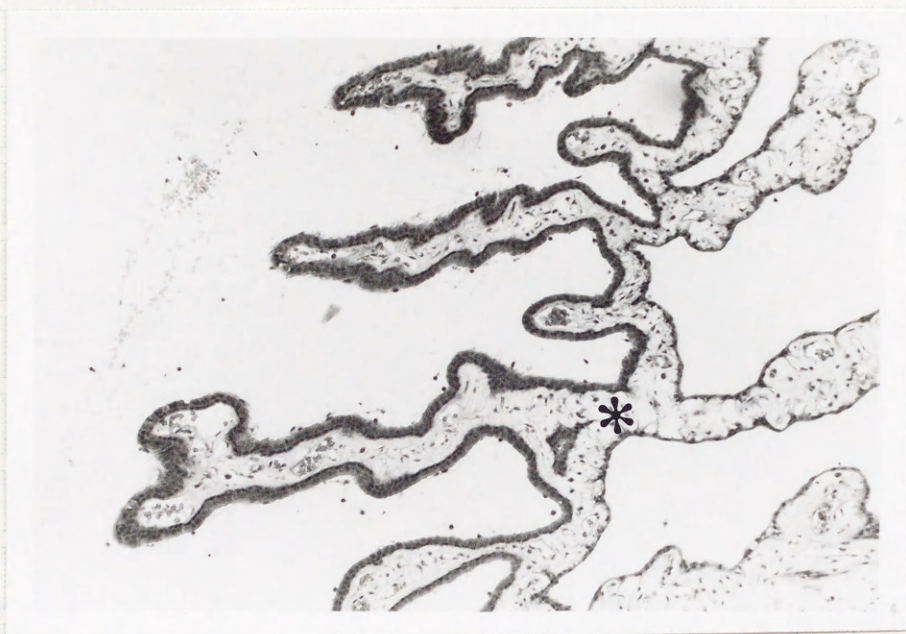


図 9 硝子体手術後 2 週目 (x100)

実質の浮腫 ( \* ) は改善しつつあった。





図 1 0 硝子体手術後2週目 (x400)

丸い核をもつ無色素上皮細胞の重層化している部分 (矢印) が見られ、増殖性変化と考えられる。



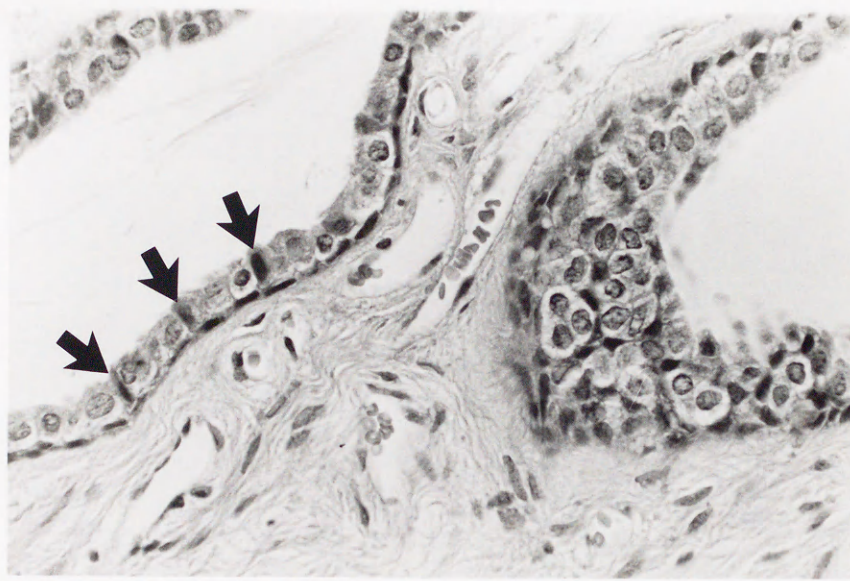


図 1 1 硝子体手術後2週目 (x400)

毛様突起の基部付近に矢印に示すような色素上皮細胞の一部が無色素上皮細胞の間に入り込んでいると考えられる部分も見られる。



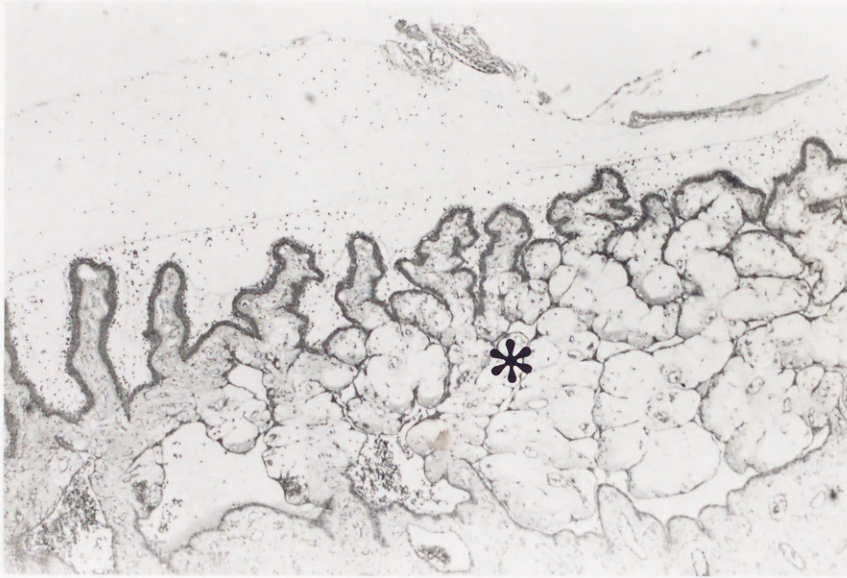


図 1 2 SF<sub>6</sub>注 入 群 の 術 後 1 日 目 (x100)

血 管 の 拡 張 と 強 い 実 質 の 浮 腫 ( \* ) を と も  
な っ て い る 。





図 1 3 シ リ コ ン オ イ ル 注 入 群 の 術 後 1 日  
目 ( x 1 0 0 )

血 管 の 拡 張 と 強 い 実 質 の 浮 種 ( \* ) を と も  
な っ て い る 。





図 1 4      SF<sub>6</sub> 注 入 群 の 術 後 2 週 目 ( x 1 0 0 )

硝 子 体 手 術 単 独 群 の 術 後 2 週 目 と 比 べ る と

実 質 の 浮 種 ( \* ) と 血 管 の 拡 張 は 強 か っ た 。



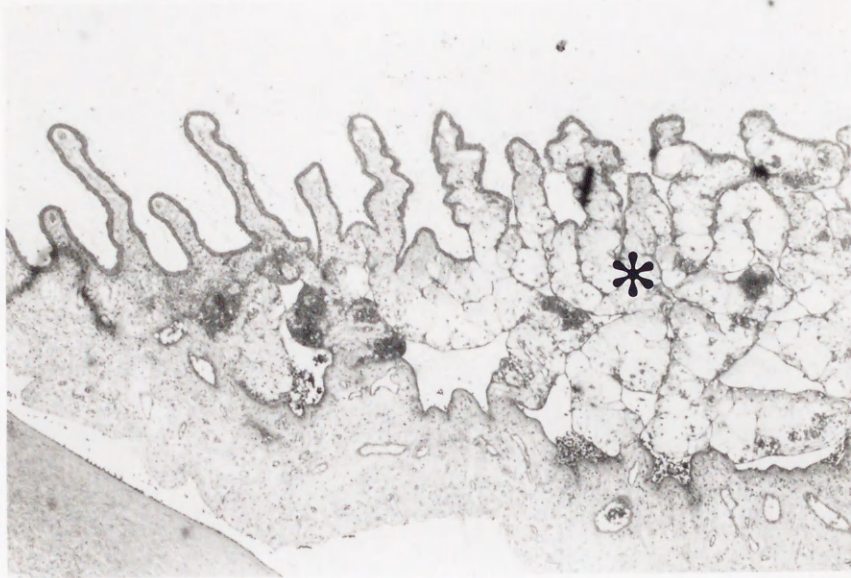


図 1 5 シ リ コ ン オ イ ル 注 入 群 の 術 後 2 週 目 ( x 1 0 0 )

硝子体手術単独群の術後2週目と比べると  
実質の浮種（\*）と血管の拡張は強かった。



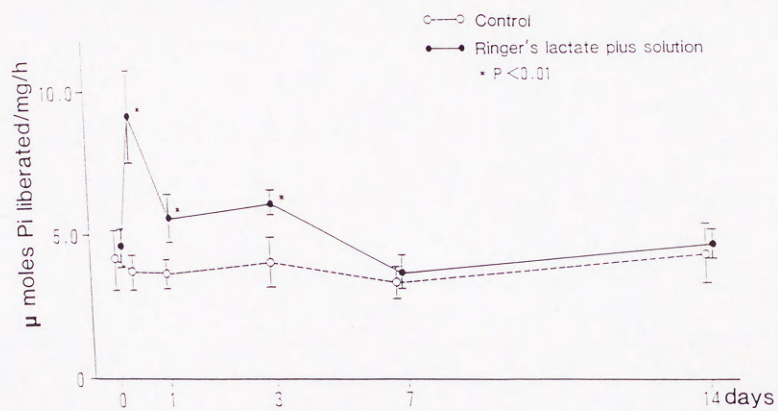


図16 硝子体手術単独群の虹彩毛様体の Na-K ATPase活性の変化  
 酵素量は蛋白質量として約 10 $\mu$ g、反応時間は20分間で活性を測定した。それぞれの点は平均 $\pm$ 標準偏差 ( $\mu$  moles Pi liberated/mg/h)を示した。対照眼の0時間目, 7時間目, 3日目はn=4で他はn=3である。手術眼の0時間目, 3日目, 7日目はn=4で他はn=3である。



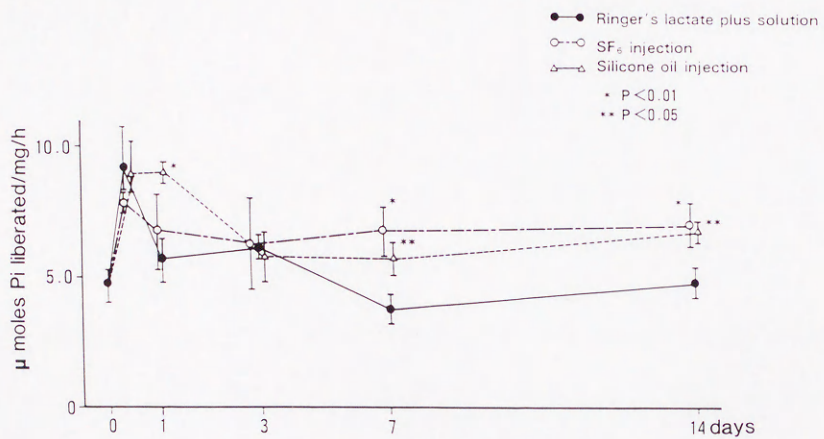


図17 SF<sub>6</sub>注入群およびシリコンオイル注入群の虹彩毛様体のNa-K ATPase活性の変化

酵素量は蛋白質量として約10μg、反応時間は20分間で活性を測定した。それぞれの点は平均±標準偏差(μmoles Pi liberated/mg/h)を示した。SF<sub>6</sub>群の手術眼では1日目、7日目はn=4で他はn=3である。シリコンオイル群の手術眼では14日目がn=3でそれ以外はn=4である。



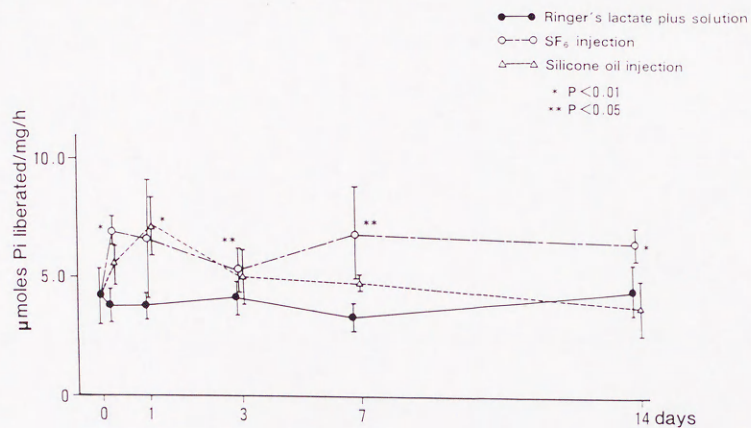
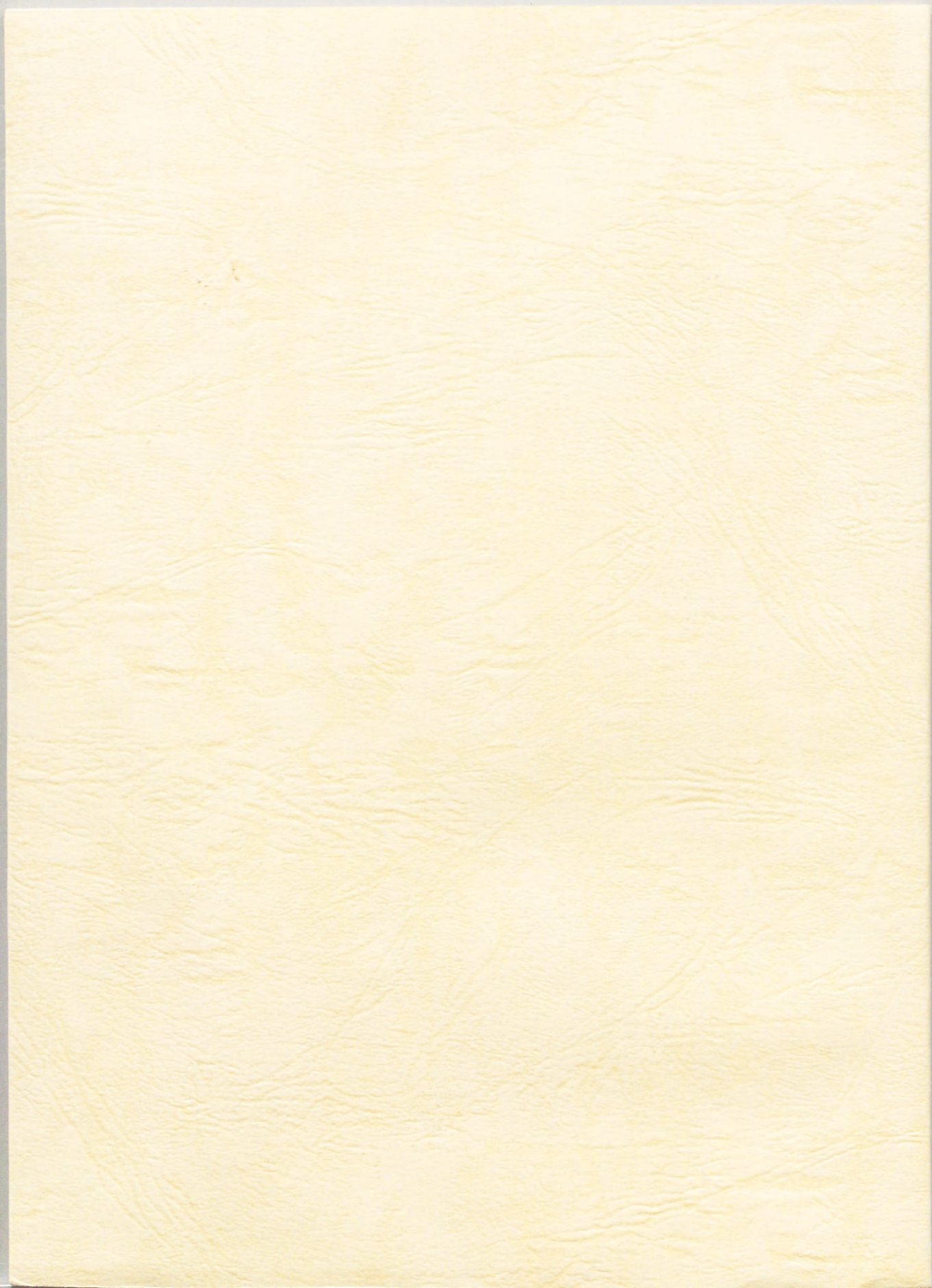
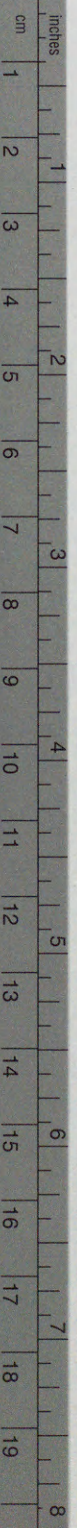


図18 硝子体手術単独、SF<sub>6</sub>注入群およびシリコンオイル注入群の対照眼におけるの虹彩毛様体の Na-K ATPase活性の変化  
 酵素量は蛋白質量として約 10μg、反応時間は20分間で活性を測定した。それぞれの点は平均±標準偏差 (μmoles Pi liberated/mg/h)を示した。SF<sub>6</sub>注入群の対照眼ではn=4である。シリコンオイル注入群の対照眼では1日目、7日目、14日目はn=3で他はn=4である





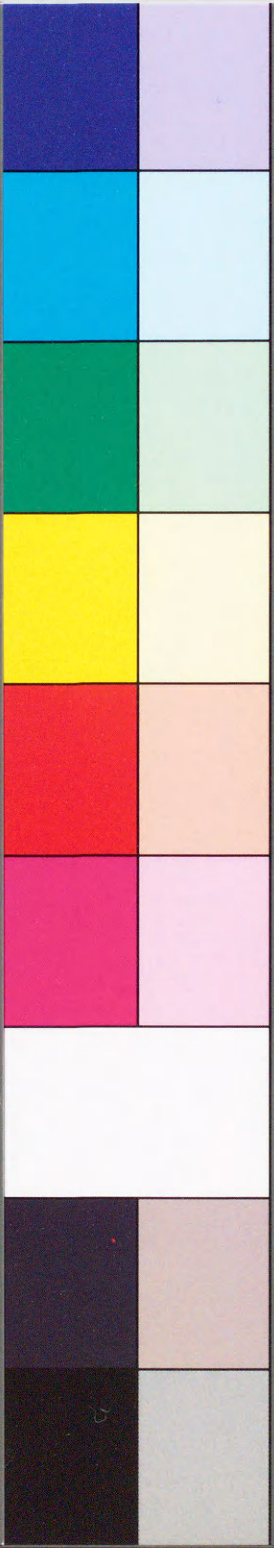




# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue      Cyan      Green      Yellow      Red      Magenta      White      3/Color      Black



## Kodak Gray Scale

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19



© Kodak, 2007 TM: Kodak